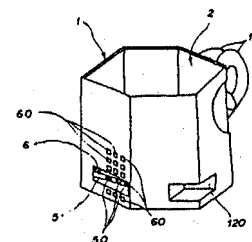
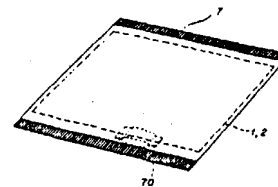


**(54) URINE EXAMINATION CONTAINER**

(11) 1-314964 (A) (43) 20.12.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-146883 (22) 16.6.1988  
 (71) ISAO HIRATA (72) ISAO HIRATA  
 (51) Int. Cl.<sup>4</sup> G01N33/48, A61B5/20

**PURPOSE:** To simply and accurately compare the color of a specimen with a standard color to judge the same and to preserve an examination container for a long period of time by hermetically sealing a container body by an outer packing bag composed of a material protecting a reagent from the stimulation of light, water and air.

**CONSTITUTION:** When a container main body (body 1, bag body 2) is taken out of an outer packing bag 7 to be assembled into a cup shape, a stick 5 is opened to generate a gap between the stick 5 and the container main body. Next, a necessary amount of urine is received in the bag body 2 and all of the received urine is disposed to again fold the bag body 2 into a flat state along fold lines 30. Whereupon, the stick 5 is inserted between the folding part 20 of the bag body 2 and a W-shape bottom part 25 to be closed in opposed relation to a see-through part 6. After the bag body 2 is allowed to stand for a predetermined time, the reagent 50 of the stick 5 can be directly compared with the upper and lower standard colors 60 of the see-through part 6 to be judged. Since the container body is sealed by the outer packing bag 7 composed of material quality protecting the reagent 50 from light, water and air, the reagent 50 can be protected and the container body can be preserved for a long period of time.

**(54) METHOD FOR DETECTING OBJECTIVE NUCLEIC ACID IN SPECIMEN**

(11) 1-314965 (A) (43) 20.12.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-149157 (22) 16.6.1988  
 (71) WAKUNAGA PHARMACEUT CO LTD (72) AKIO YAMANE(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>4</sup> G01N33/50, C07H21/04, C12N15/00, G01N33/58//C12Q1/68

**PURPOSE:** To easily detect a specific base sequence with high sensitivity by using at least one kind of a primer complementary to a nucleic acid sequence to be detected.

**CONSTITUTION:** At least one specimen ready to detect whether objective nucleic acid (hereinafter referred to as nucleic acid I) is prepared. Next, single stranded nucleic acid (hereinafter referred to as nucleic acid II) complementary to said nucleic acid I and having a length less than that of the nucleic acid I but sufficient to be specifically hybridized with the nucleic acid I is prepared. At least one kind of a primer (nucleic acid II) complementary to a nucleic acid sequence to be detected is used to separate double stranded nucleic acid obtained by performing the elongation reaction of the primer complementary to said nucleic acid sequence or double stranded nucleic acid formed by both elongation products of the primer from single stranded nucleic acid (primer) or chain-lengthening unit nucleic acid. By this method, the presence of double stranded nucleic acid is investigated and the objective nucleic acid sequence can be detected.

**(54) DETECTION OF BIOLOGICAL SUBSTANCE**

(11) 1-314966 (A) (43) 20.12.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-145787 (22) 15.6.1988  
 (71) HITACHI LTD (72) KAZUNOBU OKANO(2)  
 (51) Int. Cl.<sup>4</sup> G01N33/543, C12Q1/00, G01N33/58

**PURPOSE:** To measure a reaction product enzymatically with high sensitivity by separating a substance prepared by enzyme from a carrier-containing system before performing other enzymatic reaction.

**CONSTITUTION:** A substance to be measured is bonded to a water-insoluble carrier directly or through the ligand fixed to said carrier and a ligand labelled with enzyme is bonded to said substance to be measured. Next, the substance prepared by enzyme is separated from the carrier containing system. Further, the substance thus prepared is measured by other enzymatic reaction. For example, when polynucleotide is detected, as a specimen, a carrier, an enzyme labelled ligand or the like, the materials of an attached table are used and a low concn. specimen can be measured with high sensitivity. Since a reaction time due to other enzyme can be set while the advance degree of reaction is investigated, a high concn. specimen can be measured within a short time and a substance formed by reaction can be measured within a short time and a high concn. specimen can be also measured.

specimen : pMM 984 DNA brought to a straight chain state by restriction enzyme XhoI

carrier : nitrocellulose filter

enzyme labelled ligand : pMM 984 DNA having alkali phosphatase (EC. 3. 1. 3. 1) bonded thereto using biotin-avidin system

substrate of alkali phosphatase : oxide form of nicotinamide-adenine nucleotide phosphoric acid (hereinafter referred to as NADP\* for short)

other enzyme : alcohol dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 1) and diaphorase (EC. 1. 6. 4. 3)

detection substance : formazan generated by reducing tetrazolium salt using the above mentioned other enzyme recycling system

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-314965

⑤Int.Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成1年(1989)12月20日  
 G 01 N 33/50 P-7055-2G  
 C 07 H 21/04 B-7417-4C  
 C 12 N 15/00 8717-4B  
 G 01 N 33/58 A-7055-2G  
 // C 12 Q 1/68 A-6807-4B 審査請求 未請求 請求項の数 3 (全16頁)

⑭発明の名称 検体中の目的核酸の検出法

⑰特 願 昭63-149157

⑱出 願 昭63(1988)6月16日

⑲発明者 山 根 明 男 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研  
 究所内  
 ⑲発明者 中 上 智 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研  
 究所内  
 ⑲発明者 岡 孝 紀 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研  
 究所内  
 ⑳出 願 人 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市福島区福島3丁目1番39号  
 ㉑代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

検体中の目的核酸の検出法

## 2. 特許請求の範囲

1. 下記の工程(イ)～(ヲ)を実施すること  
 を特徴とする、検体中の少くとも一つの目的核  
 酸の検出法(ただし、工程(ハ)～(ル)は、該  
 目的核酸が存在するものとして実施するものとす  
 る)。

(イ) 少くとも一つの目的核酸(以下、核酸(I)  
 という)存在の有無を検知しようとする検体  
 を用意すること。

(ロ) 核酸(I)と相補的で、該核酸よりは短い  
 が該核酸と特異的にハイブリダイズするのに  
 十分な長さの一本鎖核酸(以下、核酸(II)  
 という)を用意すること。

(ハ) 該検体中において、核酸(I)を、これが  
 一本鎖のものであればそのまま、これが二

本鎖のものであれば一本鎖にしてからその少  
 なくとも一方について、核酸(II)とハイブ  
 リダイズさせ、この核酸(II)をプライマー  
 としてそこへ単位核酸を付加させることによ  
 って鎖長を伸長させて、生成合成核酸鎖と  
 核酸(I)との二本鎖核酸を形成させること  
 と。

(ニ) 必要に応じて、核酸(I)が二本鎖のもの  
 であったときに各鎖について工程(ロ)およ  
 び(ハ)を実施して得られる二種の二本鎖核  
 酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、該検体  
 中において、その生得的な相補性を利用して  
 相互にハイブリダイズさせること。

(ホ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)または  
 (イ)～(ニ)を実施して得られる二本鎖核  
 酸について、これを一本鎖にした後、その少  
 くとも一方について、核酸(II)とハイブ  
 リダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させるこ  
 とによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形  
 成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成

工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ヘ) 必要に応じて、(ホ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1

補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(リ) 必要に応じて、(チ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(III)および/または(II)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うかまたは複数回にわたって順次段階的に繰り返して行なうこと。

(ヌ) 工程(ハ)(ニ)(ホ)(ヘ)(チ)(リ)のいずれかによる産物である二本鎖核酸に、

回行うかまたは複数回にわたって順次段階的に繰り返して行なうこと。

(ト) 必要に応じて、核酸(I)の核酸(II)とハイブリダイズする塩基部分より5'側の塩基部分と相補的で、該塩基部分より短い該塩基部分と特異的にハイブリダイズするのに充分な長さの一本鎖核酸(以下核酸(III)という)を用意すること。

(チ) 必要に応じて、工程(イ)~(ハ)、(イ)~(ニ)、(イ)~(ホ)、または(ヘ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少くとも一方について、核酸(III)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相

下記のいずれかの手段によって、検出可能な標識からなる官能基を持たせること。

(i) 官能基を持つ核酸(II)または(III)を使用する。

(ii) 官能基を持たない核酸(II)または(III)を使用する場合は、官能基を持つ単位核酸の使用によって、該合成核酸鎖を官能基を持つものとして得る。

(iii) 該合成核酸鎖を官能基を持たないものとして形成させ、その後、そこへ、該検体中において、官能基を導入する。

(ル) 官能基をもつ二本鎖核酸を含む検体を二本鎖核酸と一本鎖核酸および単位核酸とに対して選択的吸着能を持つ固体吸着剤に接触させて、該二本鎖核酸と一本鎖核酸および/または単位核酸とを分離すること。

(ヲ) 工程(ル)より得られる官能基をもつ二本鎖核酸を、該標識からなる官能基を利用する検出操作に付して、この核酸の有無を、検出すべき核酸に対応するものとして検知すること。

と。

2. 固体吸着剤が逆相系の吸着剤である請求項第1項記載の検出法。

3. 逆相系の吸着剤がシリカゲル誘導体である請求項第2項記載の検出法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (発明の背景)

#### 技術分野

本発明は、いわゆるハイブリダイゼーション法を用いなくて特定の遺伝子の塩基配列を検出する方法に関する。より詳細には、検出すべき核酸配列に相補的な少くとも1種のプライマーを用いて、核酸配列に相補的なプライマーの伸長反応を行って得られる二本鎖核酸またはプライマーの伸長生成物同士で形成された二本鎖核酸を、一本鎖核酸あるいは単位核酸と分離することによって、検出すべき核酸を検出する方法に関する。

#### 先行技術

遺伝子の分子生物学の急速な進歩に伴い、特定

で手間がかかり、機械化の努力もされているにもかかわらず、未だに多数の試料をルーチン作業として分析することは不可能である。これらの問題を解消するためにプローブを担体に固定するハイブリダイゼーション法が工夫されているが(例えば、T.R. Gingeras ら: *Nucleic Acids Res.* **15**, 5373-5390)、このような液相・固相間のハイブリダイゼーションには限界があり、感度等の点で実際に応用できる方法とはなり得ていない。これらの液相・固相間のハイブリダイゼーションの欠点を克服するためにサンドイッチ型の液相・液相ハイブリダイゼーションが工夫されている(例えば、Ann-Christine Syvaenenら: *Nucleic Acids Res.* **14**, 5037-5048 (1986)、特開昭62-229068号公報)。しかしながら、これらの方法も、プローブを大過剰に使う事から来る高いバックグラウンドや感度の点で、満足いくものとはなり得ていない。

また、感度を向上させるために、特定の核酸配列を増幅する方法が開発されているが(特開昭

の遺伝子の塩基配列を検出することはきわめて重要なものとなってきている。例えば、遺伝病の出生前診断、癌の分子レベルでの診断あるいはウイルスのような病原体の検出において遺伝子の検出を行うことは重大な意義がある。

このような遺伝子の検出を行うには、一般的にはハイブリダイゼーションと呼ばれる方法が使われる(B.D. Hames および S.J. Higgins :

*Nucleic acid hybridization, a practical*

*approach*, IRL Press, 1985)。この方法は、標識配列と相補的な塩基配列をもつ単鎖あるいは相補鎖を放射性あるいは非放射性的の標識物質で標識し、そののち標的配列との相補性を利用して結合させて、すなわちハイブリダイズさせて、標的配列を検出する方法である。この場合、一般的には、標的物質を担体に固定するドットハイブリダイゼーション法(DNA, **4**, 327-331, (1985))あるいはサザンハイブリダイゼーション法(*Molecular Cloning*, p382, Cold Spring Harbor (1982))等が行われる。しかしながら、これらの方法は煩雑

62-281号公報)、この方法においてもハイブリダイゼーションの操作は必要であって、煩雑さを減じることになっていない。

#### (発明の概要)

#### 要 旨

本発明は、上記問題点を解決し、特定の塩基配列を容易にしかも感度よく検出する方法を与えることを目的とし、検出すべき核酸配列に相補的な少くとも1種のプライマーを用いて、該核酸配列に相補的なプライマーの伸長反応を行って得られる二本鎖核酸、またはプライマーの伸長生成物同士で形成された二本鎖核酸を、一本鎖核酸(プライマー)あるいは鎖長伸長用単位核酸と分離した後、二本鎖核酸の存在を調べることにより目的の核酸配列を検出する方法である。

即ち本発明による核酸配列の検体中の検出法は、下記の工程(イ)～(ヲ)を実施することを特徴とするものである(ただし、工程(ハ)～(ル)は、目的の核酸配列が存在するものとして実施するものとする)。

(イ) 少くとも一つの目的核酸(以下、核酸(I)という)存在の有無を検知しようとする検体を用意すること。

(ロ) 核酸(I)と相補的で、該核酸よりは短い該核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの一本鎖核酸(以下、核酸(II)という)を用意すること。

(ハ) 該検体中において、核酸(I)を、これが一本鎖のものであればそのまま、これが二本鎖のものであれば一本鎖にしてからその少くとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、この核酸(II)をプライマーとしてそこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて、生成合成核酸鎖と核酸(I)との二本鎖核酸を形成させること。

(ニ) 必要に応じて、核酸(I)が二本鎖のものであったときに各鎖について工程(ロ)および(ハ)を実施して得られる二種の二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、該検体

核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うかまたは複数回にわたって順次段階的に繰り返して行なうこと。

(ト) 必要に応じて、核酸(I)の核酸(II)とハイブリダイズする塩基部分より5'側の塩基部分と相補的で、該塩基部分より短い該塩基部分と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの一本鎖核酸(以下核酸(III)という)を用意すること。

(チ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)、(イ)～(ニ)、(イ)～(ホ)、または(ヘ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これ

中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせること。

(ホ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)または(イ)～(ニ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少くとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ヘ) 必要に応じて、(ホ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(II)とハイブリダイズさせ、そこへ単位

を一本鎖にした後、その少くとも一方について、核酸(III)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(リ) 必要に応じて、(チ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(III)および/または(II)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(I)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させ

た後、核酸(I)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うかまたは複数回にわたって順次段階的に繰り返して行なうこと。

(ヌ) 工程(ハ)(ニ)(ホ)(ヘ)(チ)(リ)のいずれかによる産物である二本鎖核酸に、下記のいずれかの手段によって、検出可能な標識からなる官能基を持たせること。

- (i) 官能基を持つ核酸(II)または(III)を使用する。
- (ii) 官能基を持たない核酸(II)または(III)を使用する場合は、官能基を持つ単位核酸の使用によって、該合成核酸鎖を官能基を持つものとして得る。
- (iii) 該合成核酸鎖を官能基を持たないものとして形成させ、その後、そこへ、該検体中において、官能基を導入する。

酸から分離して目的の標識二本鎖核酸のみを検出することからなり、いわゆるハイブリダイゼーション法という煩雑な操作を必要とせず、現在、他の分野例えば抗原抗体反応の分野で利用されている装置を容易に本法に応用することができる。その結果、一度に多検体を分析することができる。

そして、核酸のハイブリダイゼーションやゲル電気泳動での核酸の分離を必要としないため、核酸を含む試料は粗精製の状態でよく、試料の調製も容易で、装置を用いて行うことができる。

また、本発明ではハイブリダイゼーションを行わないでプライマーによる伸長反応を行うために、分析時間を大幅に短縮することができる。また、本測定法においてあらかじめ用意しておく標識物質としては、標識化プライマーあるいは標識化モノヌクレオチドでいずれも化学的に大量合成でき、従来のハイブリダイゼーション法のように天然のDNAフラグメントを酵素等を使って標識する必要はない。

さらに、それぞれの検出しようとする試料中に

(ル) 官能基をもつ二本鎖核酸を含む検体を二本鎖核酸と一本鎖核酸および単位核酸とに対して選択的吸着能を持つ固体吸着剤に接触させて、該二本鎖核酸と一本鎖核酸および/または単位核酸とを分離すること。

(ヲ) 工程(ル)より得られる官能基をもつ二本鎖核酸を、該標識からなる官能基を利用する検出操作に付して、この核酸の有無を、検出すべき核酸に対応するものとして検知すること。

#### 効果

本発明においては、先に出願した方法(特願昭62-328785号明細書参照のこと)同様、検体中の一種以上の目的核酸の存在の有無を同時にしかも迅速に検出できる点に特徴がある。

本発明による核酸配列の検出法は、前記で定義したように、ポリメラーゼなどを用いた一連の反応で、標識した検出対象物の複製物(標識二本鎖核酸)を得、これを適当な固体吸着剤を用いて検体中の標識一本鎖プライマーあるいは標識単位核

酸において、目的核酸(I)の塩基配列が微妙に(一塩基以上)異なる場合も、ポリメラーゼ等の反応条件を適当に調節することにより、プライマーが目的核酸に完全に相補的である場合とそうでない場合を区別することができる。つまり、ハイブリダイゼーション法等によらないで容易に点突然変異をも検出することができる。

そして、それぞれ官能基の異なる標識物質で標識された複数のプライマーを使用すれば、同時に一種類以上の目的核酸(I)に対する伸長反応を行う事ができ、それぞれの標識物質の官能基を利用する検出操作を行う事によって、同時に多数の目的核酸の存在の有無を調べる事ができる。

[発明の具体的説明]

#### 検出原理

本発明による目的核酸の検出法は前記の工程(イ)~(ヲ)を含んでなるが、この方法は、(i) 検体中の目的核酸(核酸(I)という)からそれと相補的な核酸を検体中でつくって(この核酸を合成核酸という)二本鎖を形成させ、それについ

て検出を行うこと、(II)検体中の合成核酸を作る際にプライマーあるいは鎖長伸長用単位核酸を適当な官能基をもつ標識物で標識しておくことにより合成核酸を標識物質を持つものとして得ること、あるいは事後的に標識物質を導入すること、(III)上記(II)で得られた標識物質を導入した合成核酸を適当な固体吸着剤を用いて標識物質をもつ一本鎖プライマーあるいは単位核酸から分離して、目的とする標識合成核酸を選択的に検出することを基本原理とするものである。

このように、適当な官能基で標識したプライマーあるいは単位核酸を用いてポリメラーゼによる伸長反応を行った場合、反応液中の標識物質は、合成核酸とプライマーあるいは単位核酸だけに存在する(合成核酸は、目的核酸と二本鎖を形成しているか、あるいは合成核酸同士で二本鎖を形成している)。そこで、該合成核酸とプライマーとを分離する場合は、二本鎖核酸と一本鎖核酸を分離できる固体吸着剤を用いればよいし、合成核酸と単位核酸を分離する場合二本鎖核酸と単位核酸

ることによって行うことができる。このようにして得られる官能基を持つ合成核酸鎖の具体例を挙げれば、目的核酸(I)が二本鎖である時に一方または両方の鎖について、また、一本鎖であるときにはそれについて、官能基を持つプライマーあるいは持たないプライマー(核酸(II))をハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸としてdATP、dGTP、dCTP、TTP存在下、DNAポリメラーゼを働かせて該プライマーの鎖長を伸長させる際に、必要に応じて(官能基を持たないプライマーを用いる場合は必ず)単位核酸の一個ないし一種あるいは複数個ないし複数種に標識を持たせたものを使用して原DNA鎖と合成核酸鎖との二本鎖としたもの、二本鎖DNA鎖の一方について上記の通りに二本鎖構造体をつくり、他方のDNA鎖についても上記の通りに二本鎖構造体をつくり、両二本鎖構造体から原DNA由来の鎖を除去して合成鎖を遊離させ、両合成鎖をハイブリダイズさせて、プライマーから供給された官能基を持つ二本鎖としたもの(遊離させた各合成鎖

とをそれぞれ分離できる固体吸着剤を用いれば良い。

このようにして、目的核酸の塩基配列を写しとった合成核酸を、それに導入された標識物質を用いて検出することによって目的核酸を検出することができる。なお、検体中に目的核酸が存在しなければ、標識物質が導入された合成核酸が生成しないことから、検出結果は、検体中には目的核酸不在となる。

このような選択検出性を実現すべき前記官能基の導入は、所謂プライマー(前記の核酸(II))を使用して、たとえば目的核酸がDNAであればそれを一本鎖にしてからDNAポリメラーゼにより、目的核酸がRNAであれば逆転写酵素によって、プライマーから鎖長を伸長させ、その際に、プライマーとして官能基をもつものあるいはもたないものを使用し、鎖長延伸の際のモノマーないし単位核酸として官能基をもつものまたはもたないものを使用して、これらの適宜な組合せにより最終的に該合成核酸を官能基を持つものとして得

についてプライマーの付加および(または)鎖長の伸長ないし合成鎖の形成を行って、合成鎖からなる二本鎖の増幅を行うこともできる)、その他がある。また官能基の導入は、その他の合目的な方法によって実施することができ、目的とする合成核酸を形成させた後、任意の官能基を導入することもできる。このような反応において、導入される官能基は少なくとも一種類で良い。

また、ポリメラーゼによるプライマーの延伸反応は、別々の官能基または同一の官能基をもつそれぞれ別々のプライマーを用いて、同一検体中複数個の目的核酸(I)に対して同時に検出を行うこともできる。

#### 検出の実際

##### a. 核 酸

本発明でいう検出すべき核酸とは、検出しようとする塩基配列を含むものであって、DNAでもRNAでもよい。このような核酸は大腸菌、ビールスおよび高等動物などあらゆる生命体から調製することができる。また、上記核酸を、本検出

法に用いる場合、核酸は精製されていても、されていなくてもよい。

#### b. プライマーおよびその伸長反応

##### (i) プライマー（核酸（Ⅱ））

本発明でいうプライマーは、検出しようとする上記核酸の塩基配列（DNAの場合は変性などの手段により、日本鎖核酸配列を一本鎖にする必要がある）と特異的に相補鎖を形成し、その3'末端にモノヌクレオチドが順次付加されるもので、3'末端の水酸基が不可欠である。一般に、プライマーとはオリゴデオキシリボヌクレオチドのことをさすが、天然から得られる長鎖のDNAフラグメントでもよい。目的核酸（核酸（Ⅰ））と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さのものであるべきである。

点突然変異を検出しようとする場合は、点突然変異を起した目的核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有し、かつ完全に相補的なプライマー及び点突然変異を起してない該核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さを有

し、かつ完全に相補的なプライマーの二種を用いる。これらのプライマーはいずれもオリゴデオキシリボヌクレオチドである。

この様な一連のプライマーの具体例としては何も修飾されていないプライマーまたは標識物質が導入されたプライマーを用いることができる。

なお、ここでいうプライマーの標識物質は、プライマーの伸長反応を妨げない位置であればどこでもよいが、好ましくは5'末端である。

標識物質としては、非放射性、放射性物質のどちらを用いてもよい。

非放射性の標識物質としては、例えば後記実施例で示したフルオレセインおよびその誘導体〔フルオレセインイソチオシアネート（FITC）〕、ローダミンおよびその誘導体〔例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネート

（TRITC）、テキサスレッド等〕、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラン（NBD-F）およびダンシルなどの蛍光物質あるいは化学発光物質などがあり、いずれも公知手段（特開昭59-

93098号、特開昭59-93099号各公報参照）により、標識化を行うことができる。

また、放射性物質で標識する場合は、例えば $^{131}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等の放射性同位元素を用いて公知の手段により標識物質を導入することができる。

##### (ii) プライマーの伸長反応

上記プライマーのうち、プライマーが標識されていないものを用いた場合、伸長反応は標識物質が導入された4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸であるデオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸およびチミジン三リン酸のうち少くとも1種類を基質としてプライマーにとりこませることができる。また、標識されているプライマーを用いる場合、標識または非標識の上記4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸のうち少くとも一種類を基質として同様にプライマーにとりこませることができる。この伸長反応にはE. コーリDNAポリメラーゼI、E. コーリDNAポリメ

ラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ、あるいは逆転写酵素が使用できる。特に、高温で伸長反応を行える耐熱酵素を用いればプライマーによる標的配列認識の特異性を高めることもでき、点突然変異等を検出する場合にもこの耐熱酵素が好ましい。

また、より高感度の検出が求められる時、特に検出対象の塩基配列の量が少ない時は、核酸配列の増幅法を用いることができる（特開昭62-281号公報）。すなわち、上記記載の標識プライマーおよび標識モノヌクレオチド三リン酸を使えば、容易に二種類の官能基（固相担体と結合可能な部位または検出に用いる標識物質）を持たせた標的塩基配列を増幅して得ることができる。

また、上記プライマーの伸長反応によって得られる二本鎖核酸を一本鎖にした後、再びプライマーによる伸長反応を行なう工程を順次段階的に繰り返して行なうことにより、標識された合成核酸鎖が増幅され、検出感度を高めることができる。

また、プライマーの伸長反応が正しく目的の位



置で始まるためには、プライマーと鋳型(すなわち目的核酸(I))との間での相補性の度合、プライマーの長さ、反応温度、などの因子を考慮しなければならない。一般に、プライマーの長さが短い場合や、相補性の度合が低い場合は、反応をより低い温度にしなければならないことはいうまでもない。

また、プライマーの伸長反応をより正しい目的の位置で行わせるためには、最初のプライマー(核酸(II))の伸長反応以降に、得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、目的核酸(I)の、核酸(II)とハイブリダイズする塩基部分より5'側の塩基部分と相補的で、該塩基部分より短い該塩基部分と特異的にハイブリダイズするのに充分な長さの一本鎖核酸(核酸(III))を用いてさらに新たな伸長反応を行うことが好ましい。

さらに、本法を用いて点突然変異などを検出する場合は、上記に増してプライマーの伸長条件を考慮しなければならない。たとえばプライマーと

目的核酸(I)との間で形成した二本鎖(完全に相補的である場合とそうでない場合)の安定性に差を出すために反応液にDMSOを加えたり、競合プライマー(目的核酸(I)中の点突然変異を調べる場合、正常の塩基配列に完全に相補的なプライマーと点突然変異を起した塩基配列に完全に相補的なプライマーの2種を混合してプライマーの伸長反応を行う。この時、目的核酸(I)中の塩基配列が正常であれば後者のプライマーが競合プライマーであり、逆に目的核酸(I)中の塩基配列に点突然変異を生じている場合は前者が競合プライマーとなる。)を加えて伸長反応を行う必要がある。

### c. 固体吸着剤

本発明でいう固体吸着剤は、上記プライマーの伸長反応液中の標識物質を導入した合成核酸(二本鎖)と標識物質を導入したプライマー、または標識物質を導入した合成核酸(二本鎖)と標識物質を導入した単位核酸とを容易に分離できるものであれば何であってよい。これらの条件を満た

すものとしては、ゲルろ過法に使用される担体やイオン交換法に使用される担体が考えられる。これらの固体吸着剤は、特に標識物質を導入した合成核酸と標識物質を導入した単位核酸を分離するにはふさわしいが、標識物質を導入した合成核酸と標識物質を導入したプライマーを分離する場合には必ずしも好しくない。後者の場合にふさわしいものとしてはヒドロキシアパタイトや逆相系の固体吸着剤、例えば、シリカゲル誘導体などがあげられる。ヒドロキシアパタイトは従来より一本鎖DNAと二本鎖DNAの分離に用いられ、低リン酸緩衝液中では二本鎖DNAのみ吸着され、リン酸緩衝液の濃度を上げると二本鎖DNAも溶出してくる(Y. Miyazawa, Thomas, C.A. (1965) J. Mol. Biol. 11, 223.; M. McCallum, P.M.B. Walker (1967) Biochem. J. 105, 163)。

一方、逆相系の固体吸着剤であるシリカゲル誘導体、特にオクタデシルシランは高速液体クロマトグラフィーに頻りに利用されており、親水性または疎水性の差で物質を分離することができる。

ところで核酸上について考えると二本鎖DNAは塩基同士で水素結合し、塩基間ではスタッキングして、さらにリン酸ジエステルは二本鎖の外側に位置していることから一本鎖DNAよりも親水的である。それゆえ上記シリカゲル誘導体、例えばオクタデシルシラン等を用いれば容易に一本鎖DNAと二本鎖DNAとを分離する事ができ、しかも二本鎖DNAを最初に溶出させることができる。

ここでいう、逆相系の固体吸着剤とは、シリカゲル等に、ジメチルシラン、オクタデシルシラン、オクチルシラン等の炭素数1~18の炭化水素残基を持つシランを化学結合させたものや、スチレン・ジビニルベンゼン系共重合体あるいはゲル河過剤等、極性の小さい樹脂からなるものである。また、必要に応じて第1図に示したような装置を用いれば、既存の抗体の分野で使用されている機器(たとえばプレート洗浄機)と組み合わせることにより、一連の操作を自動化することができる。この場合、固体吸着剤2はテーバーを有するチップ

プ1に、フィルター3、3を使用して充填してある。

#### d. 検出方法

プライマーの伸長反応で得られた標識合成核酸(二本鎖)と標識物質をもつ他のものとを固体吸着剤を用いて分離する場合、次の二通りがある。

(I) 標識合成核酸が標識物質をもつ他のものより先に溶出する場合(あるいは標識合成核酸のみが選択的に固体吸着剤に吸着されないで溶出する場合)。(II) 標識合成核酸が標識物質をもつ他のものよりも後に溶出する場合。

(I) の場合は最初に溶出した液をそのまま、(II) の場合は標識合成核酸以外の標識物質をもつたものを十分洗浄して除いたあと標識合成核酸を溶出し、その液中に含まれる標識物質を測定すれば良い。標識物質がアイソトープである場合はシンチレーターを用いて、蛍光、あるいは発光物質である場合それぞれに応じた既知の測定法で測定する。また、一度に複数の目的核酸を検出する場合、それぞれの標識物質に対応する測定は同一

試料を用いて行うことができる(たとえばそれぞれの標識物質が蛍光特性の異なる蛍光物質で標識されている場合、それぞれのけい光物質に合った励起波長と蛍光波長を選べば良い)。

実際には、第1図に示したような受器5または5'を使用し、標識物質がアイソトープである場合はベータプレート<sup>R</sup>(LKB)等の機器、標識物質が蛍光物質である場合はマイクロプレート用自動蛍光測定装置を使用すれば良い。上記受器5または5'を使用する場合、固体吸着剤2を充填した前記チップ1をマイクロタイターウェル状のもの4に装着し、これを図示したように上記受器5または5'に被せるようにして使用すれば良い。なお、図中Bは、標識合成核酸(二本鎖)を溶出させる場合であり、またAは標識プライマーあるいは標識単位核酸を溶出する場合である。

#### 実験例

##### 実施例1

一本鎖DNAと二本鎖DNAの分離をオクタデシルシラン(マイクロボンダバックC18、ウォ

ーターズ社)を用いて行った。

試料1: オリゴデオキシヌクレオチド

5' H<sub>2</sub>OACACAACCTGTGTTCACCTAGC  
をT<sub>4</sub>ポリヌクレオチドキナーゼと  
[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPで5'末端標識した。

試料2: 制限酵素HindIIIで切断すると  
3000bpと250bpのフラグメントが得られるプラスミドをHindIIIで切断し、E. Coli DNAポリメラーゼのクレナウフラグメントと[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, dATP, dGTPおよびdCTPを用いてそれぞれのフラグメントの両末端を標識した。

試料3: ヒトの胎盤のDNA(1 $\mu$ g)、試料1と同様<sup>32</sup>Pで標識したオリゴデオキシヌクレオチド<sup>32</sup>P-ACACAACCTGTGTTCACCTAGC(300ng)、オリゴヌクレオチドH<sub>2</sub>OCAACTTTCATCCACGTTTCACC(300ng)およびTaq DNAポリメラーゼ(NEB社)を用いて、NEB社のプロトコルに従って上記2種のプライマーによって夫々の

方向より $\beta$ -グロビン遺伝子の一部を増幅した。

ピペットチップ(1ml用)の先端にシリコナイズしたグラスウールをつめ(第1図参照)、エタノールに懸濁したC18樹脂(100 $\mu$ l)を加え、添加用溶液(50mM NaCl、10mM Tris·HCl pH8.0、1mM EDTA pH8.0; 1ml)で洗浄した。これにそれぞれの試料(100 $\mu$ l、NaClの濃度が50mMになるように調製した)を添加した。さらに添加用溶液(500 $\mu$ l)を添加し、溶出した液を一緒にして溶出液1とした。次に3%エタノールを含む添加用溶液(500 $\mu$ l)を添加し、溶出した液を溶出液2とした。以下溶出液のエタノール濃度を段階的に上げて溶出を行なった。溶出液3: 5%エタノール・添加用溶液(500 $\mu$ l)、溶出液4: 10%エタノール・添加用溶液(500 $\mu$ l)、溶出液5: 15%エタノール・添加用溶液、溶出液6: 20%エタノール・添加用溶液。それぞれの溶出液同量を取り、5%ポリアクリルアミド電気泳動を行なって分離状況をと

調べた。得られたX線のオートラジオグラムの結果を第2図に示した。試料1の分析結果から一本鎖DNAである

$^{32}\text{P}$ -ACACAACCTGTGTTCACTAGCは10%エタノール・添加用溶液(溶出液4)から溶出することがわかった。また試料2の分析結果から二本鎖DNAは5%エタノール・添加用溶液(溶出液3)で溶出することがわかった。さらに、試料3の分析結果から5%エタノール・添加用溶液(溶出液3)では、DNAポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖DNAのみ溶出され、10%エタノール・添加用溶液(溶出液4)では、合成された二本鎖DNAとわずかのプライマーが溶出されることがわかった。

#### 実施例2

蛍光物質で標識したオリゴデオキシヌクレオチドの逆相系(オクタデシルシラン)での挙動を調べた。

ラジオグラムの結果を第3図に示した。この結果より、オリゴデオキシヌクレオチドに蛍光標識が導入されると10%エタノール・添加用溶液(溶出液3)ではほとんど溶出されず、FITC標識(試料3)の場合特に顕著であることがわかった。

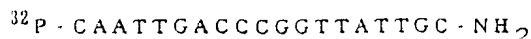
#### 実施例3

5'末端蛍光標識オリゴデオキシヌクレオチドの逆相系での挙動を蛍光を測定することにより調べた。特開昭59-93098、特開昭59-93099号各公報に従って5'末端にフルオレッセインを導入した

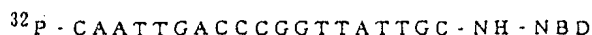
FITC-NH-ACACAACCTGTGTTCACTAGCを合成した。これを実施例2とまったく同様条件で逆相系にかけ溶出した。溶出液の蛍光強度を励起波長489nm、発光波長520nmで測定した。その結果を以下に示した。

	相対強度
溶出液1	1
溶出液2	1
溶出液3	2

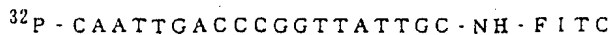
試料1:



試料2:



試料3:



3'末端にアミノ基をもつオリゴデオキシヌクレオチドの合成ならびにその蛍光標識化は特開昭59-93098号、特開昭59-93099号各公報に従って行った。また、5'末端アイソトープ標識は実施例1(試料1)と同様に行った。

逆相系での挙動を調べる実験は、実施例1とほぼ同様にして溶出液1:添加用溶液(500 $\mu\text{l}$ )、溶出液2:5%エタノール・添加用溶液(500 $\mu\text{l}$ )、溶出液3:10%エタノール・添加用溶液(500 $\mu\text{l}$ )、溶出液4:15%エタノール・添加用溶液(500 $\mu\text{l}$ )、溶出液5:20%エタノール・添加用溶液(500 $\mu\text{l}$ )、溶出液6:30%エタノール・添加用溶液(500 $\mu\text{l}$ )を用いて行った。得られたオート

溶出液4 697

溶出液5 1242

溶出液6 146

本結果より5'末端蛍光標識オリゴデオキシヌクレオチドは10%エタノール・添加用溶液(溶出液3)ではまったく溶出されないことがわかった。

#### 実施例4

DNAポリメラーゼによるプライマーの伸長反応を用いた遺伝子の検出法でヒトの $\beta$ -グロビン遺伝子を検出した。

試料1:ヒトの胎盤のDNA(1 $\mu\text{g}$ )、

FITC-NH-ACACAACCTGTGTTCACTAGC(300ng)および

$\text{HO}-\text{CAACTTTCATCCACGTTCAAC}$ をTaq DNAポリメラーゼを含まない反応液(NEB社のプロトコールに従って調製したもの。全量100 $\mu\text{l}$ )に加えた。

試料2:サケ精子DNA(1 $\mu\text{g}$ )、

FITC-NH-ACACAACCTGTGTTCACTAGC

(300 ng)、  
 HOCAACTTCATCCACGTTCAAC  
 (300 ng) および Taq DNAポリメラーゼ (NEB社) を用いてNEB社のプロトコールに従って遺伝子増幅を行った。(増幅回数: 20回、全液量: 100 µl)

試料3: ヒト胎盤のDNA (1 µg)、  
 FITC-NH-ACACAACTGTGTTCACTAGC  
 (300 ng)、  
 HOCAACTTCATCCACGTTCAAC  
 (300 ng) および Taq DNAポリメラーゼ (NEB社) を用いてNEB社のプロトコールに従って遺伝子増幅を行った(増幅回数: 20回、全液量: 100 µl)。試料1~試料3で使用したプライマーはすべて同じものの組み合わせであり、ヒトβ-グロビン遺伝子増幅用のものである。

これらの試料(50 µl)に添加用溶液(450 µl)を加えて実施例1と同様に調製した逆相樹脂に添加した。添加用溶液(500 µl)および5%エタノール・添加用溶液(500 µl)

(F-GA)、

点変異のある遺伝子と完全に相補的な

FITC-NH-CACCTGACTCCTGTGGAGAAGT

(F-GS)、および両方の遺伝子に共通な

HOCAACTTCATCCACGTTCAAC (PG2) を使用した。また競合プライマーとしてF-GAに対してはGSを、F-GSに対してはGAを使用した。

反応1: 制限酵素EcoRIで切断したpBR322-HβS (20 ng)、PG2 (300 ng)、F-GA (300 ng) およびGS (300 ng) を反応液(67 mM Tris-HCl pH8.8: 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>: 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 10 mM β-メルカプトエタノール、6.7 mM EDTA、200 µM dATP、200 µM dGTP、200 µM dCTP、200 µM TTP、10% DMSO) に加え(全液量: 49 µl)、95℃で5分間加熱変性した。65℃で1分間アニーリングしたのちTaqポリメラー

で洗浄したのち、10%エタノール・添加用溶液(500 µl)で溶出した。得られた溶出液に1M Tris-HCl (pH9.5: 25 µl)を加えてpHをおよそ8.5とし、蛍光強度を励起波長489 nm、蛍光波長520 nmで測定した。その結果を以下に示した。

試料1 試料2 試料3

相対強度 3 30 111

この結果より、本法を用いてヒトDNA中のβ-グロビン遺伝子を検出できることがわかった。

#### 実施例5

DNAポリメラーゼによるプライマーの伸長反応を用いた遺伝子の検出法で、ヒトのβ-グロビン遺伝子の突然変異を検出した。テンプレートとしてはβ-グロビン遺伝子に点変異を生じた遺伝子をもつプラスミドpBR322-HβS

(Nucleic Acids Res. 9,3647-3656 (1981)) を使用し、プライマーとしては正常な遺伝子と完全に相補的でFITCで標識した

FITC-NH-CACCTGACTCCTGAGGAGAAGT

ーゼ (NEB社、20/µl、1 µl) を加え

73℃で2分間プライマーの伸長反応を行った。

次に、92℃で1分間変性し、65℃で1分間アニーリングした。以後、変性、アニーリング、伸長反応を同様にして20回繰り返した。

反応2: 制限酵素EcoRIで切断したpBR322-HβS (20 ng)、PG2 (300 ng)、F-GS (300 ng) およびGA (300 ng) を用いて反応1とまったく同様の反応条件で伸長反応を20回繰り返した。

それぞれの反応液(50 µl)に添加用溶液(450 µl)を加えて実施例1と同様に調製した逆相樹脂に添加した。実施例4と同様に10%エタノール・添加用溶液(500 µl)で溶出し、1M Tris-HCl (pH9.5、25 µl)を加えてpHをおよそ8.5とし、蛍光強度を励起波長489 nm、発光波長520 nmで測定した。その結果を以下に示した。

## 反 応 1      反 応 2

相 対 強 度      4 5      1 3 2

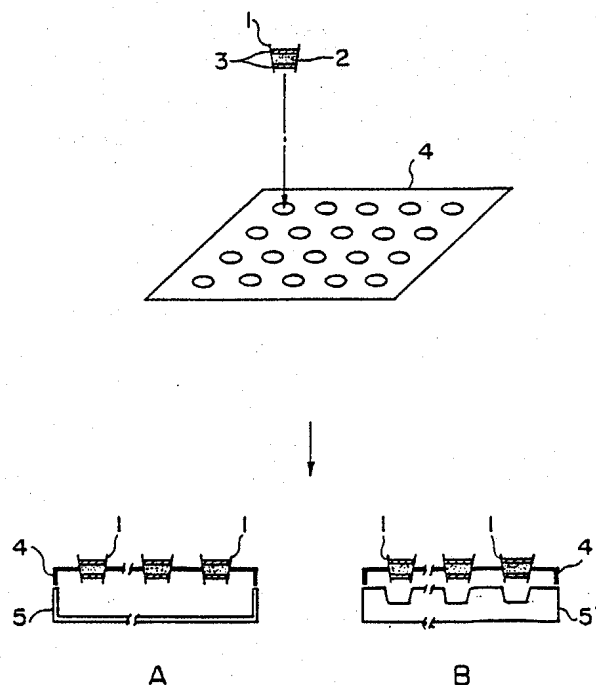
以上の結果より、F・GSをプライマーとした反応2の方が、F・GAをプライマーとした反応1より、圧倒的に伸長反応生成物が多い事から、プラスミドpBR322・HβSはグロビン遺伝子に点突然変異が生じたものであることが判定できた。

また上の結果を確かめるために、反応1または反応2のF・GAまたはF・GSを<sup>32</sup>Pで標識して同様に伸長反応を行った(反応3: pBR322・HβS (20ng)、<sup>32</sup>P-GA (300ng)、GS (300ng) 反応4: pBR322・HβS (20ng)、<sup>32</sup>P-GS (300ng)、GA (300ng))。得られた反応液を5%ポリアクリルアミド電気泳動で分析したところ(第4図)、反応4において主に伸長反応生成物が得られ、反応1、2の結果と一致した。

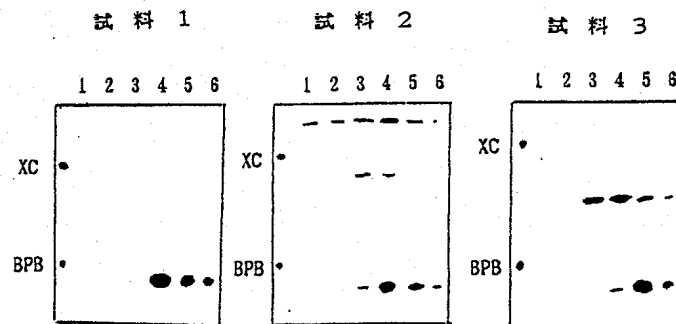
## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、マイクロプレート用自動機器に対応可能な、固体吸着剤を充填したマイクロプレートを示す説明図である。第2図は、PCR法により増幅されたβ'-グロビン遺伝子の核酸(Ⅱ)との分離結果を示すオートラジオグラムを模写したものである。第3図は、オリゴヌクレオチドの螢光物質の違いによる逆相系吸着剤上での挙動変化を示すオートラジオグラムを模写したものである。第4図は、PCR反応による点突然変異を識別するオートラジオグラムを模写したものである。

出願人代理人      佐      藤      一      雄



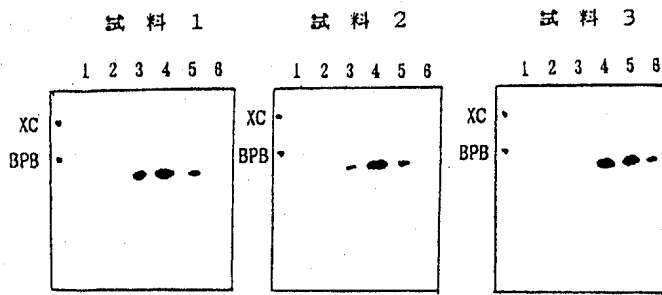
第 1 図



X C      キシレンシアノール  
B P B      プロモフェノールブルー

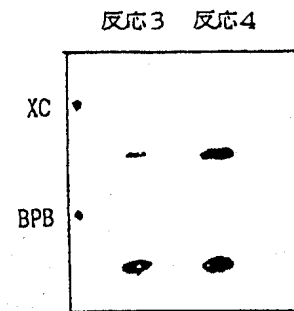
1 : 溶出液 1      4 : 溶出液 4  
2 : 溶出液 2      5 : 溶出液 5  
3 : 溶出液 3      6 : 溶出液 6

第 2 図



1 : 溶出液 1      4 : 溶出液 4  
2 : 溶出液 2      5 : 溶出液 5  
3 : 溶出液 3      6 : 溶出液 6

第 3 図



第 4 図

手 続 補 正 書

平成 1 年 9 月 14 日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1 事件の表示

昭和 63 年特許願第 149157 号

2 発明の名称

検体中の目的核酸の検出法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
湧水製薬株式会社

4 代理人 (郵便番号 100)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
[電話東京 (211)2321 大代表]

6428 井理士 佐 藤 一

5 補正により する請求項の数

6 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」及び「発明の  
詳細な説明」の各欄

7 補正の内容

(1) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。

(2) 明細書第10頁下から4行の「(ヲ)」を  
「(カ)」に補正する。

(3) 同書同頁下から3行の「(ル)」を  
「(ワ)」に補正する。

(4) 同所第12頁下から4行~第13頁11行  
の「(へ) 必要に応じて、…繰り返して行なうこ  
と。」を

「(へ) 必要に応じて、(ホ) を実施した後、最  
最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本  
鎖にして、その少くとも一方について、核酸 (Ⅱ)  
とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加さ  
せることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を  
形成させることから成る工程を、1 回行うか、ま  
たは行った後更に同様の工程を少なくとも1 回順  
次段階的に繰り返して行なうこと。」に補正する。

(5) 同書第13頁11行と12行の間に、  
「(ト) 必要に応じて、この二本鎖核酸の形成工  
程 (へ) を核酸 (Ⅰ) の各鎖について実施して最

方式 査 閱

特許庁  
1. 9. 16

最終的に得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。」を挿入する。

(6) 同書第13頁12行の「(ト)」を「(チ)」に補正する。

(7) 同書第13頁下から3行～2行の「(チ) 必要に応じて、…または(ヘ)」を「(リ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)、(イ)～(ニ)、(イ)～(ホ)、(ヘ)または(ト)」に補正する。

(8) 同書第14頁12行～第15頁7行の「(リ) 必要に応じて、…繰り返して行なうこと。」を

「(ヌ) 必要に応じて、(リ)を実施した後、最終的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(Ⅲ)および/または(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そ

こへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うか、または行った後更に同様の工程を少なくとも1回順次段階的に繰り返して行なうこと。」に補正する。

(9) 同書第15頁7行～8行の間に、

「(ル) 必要に応じて、この二本鎖核酸の形成工程(ヌ)を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して最終的に得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。」を挿入する。

(10) 同書第15頁8行の「(ヌ) 工程(ハ)…(リ)のいずれか」を「(ヲ) 工程(ハ)、(ニ)、(ホ)、(ヘ)、(ト)、(リ)、(ヌ)、(ル)のいずれか」に補正する。

(11) 同書第16頁1行の「(ル)」を「(ワ)」に補正する。

(12) 同書第16頁6行「(ヲ) 工程(ル)より」を「(カ) 工程(ワ)より」に補正する。

(13) 同書第18頁下から4行の「(イ)～(ヲ)」を「(イ)～(カ)」に補正する。

#### 特許請求の範囲

1. 下記の工程(イ)～(カ)を実施することと特徴とする、検体中の少くとも一つの目的核酸の検出法(ただし、工程(ハ)～(ワ)は、該目的核酸が存在するものとして実施するものとする)。

(イ) 少くとも一つの目的核酸(以下、核酸(Ⅰ)という)存在の有無を検知しようとする検体を用意すること。

(ロ) 核酸(Ⅰ)と相補的で、該核酸よりは短い該核酸と特異的にハイブリダイズするのに充分な長さの一本鎖核酸(以下、核酸(Ⅱ)という)を用意すること。

(ハ) 該検体中において、核酸(Ⅰ)を、これが一本鎖のものであればそのまま、これが二本鎖のものであれば一本鎖にしてからその少くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、この核酸(Ⅱ)をプライマーとしてそこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて、生成合成核酸鎖と

核酸(Ⅰ)との二本鎖核酸を形成させること。

(ニ) 必要に応じて、核酸(Ⅰ)が二本鎖のものであったときに各鎖について工程(ロ)および(ハ)を実施して得られる二種の二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせること。

(ホ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)または(イ)～(ニ)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハ

イブリダイズする塩基部分より5'側の塩基部分と相補的で、該塩基部分より短いが該塩基部分と特異的にハイブリダイズするのに充分な長さの一本鎖核酸(以下核酸(Ⅲ)という)を用意すること。

(リ) 必要に応じて、工程(イ)～(ハ)、(イ)～(ニ)、(イ)～(ホ)、(ヘ)または(ト)を実施して得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にした後、その少くとも一方について、核酸(Ⅲ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させるか、あるいはこの二本鎖核酸の形成工程を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ヌ) 必要に応じて、(リ)を実施した後、最終

イブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ヘ) 必要に応じて、(ホ)を実施した後、最終に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うか、または行なった後更に同様の工程を少なくとも1回順次段階的に繰り返して行なうこと。

(ト) 必要に応じて、この二本鎖核酸の形成工程(ヘ)を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して最終的に得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(チ) 必要に応じて、核酸(Ⅰ)の核酸(Ⅱ)と

的に得られる二本鎖核酸について、これを一本鎖にして、その少くとも一方について、核酸(Ⅲ)および/または(Ⅱ)とハイブリダイズさせ、そこへ単位核酸を付加させることによって鎖長を伸長させて二本鎖核酸を形成させることから成る工程を、1回行うか、または行った後更に同様の工程を少なくとも1回順次段階的に繰り返して行なうこと。

(ル) 必要に応じて、この二本鎖核酸の形成工程(ヌ)を核酸(Ⅰ)の各鎖について実施して最終的に得られる二本鎖核酸から該合成核酸鎖を遊離させた後、核酸(Ⅰ)の各鎖とハイブリダイズしていた合成核酸鎖同志を、該検体中において、その生得的な相補性を利用して相互にハイブリダイズさせて二本鎖核酸を形成させること。

(ヲ) 工程(ハ)、(ニ)、(ホ)、(ヘ)、(ト)、(リ)、(ヌ)、(ル)のいずれかによる産物である二本鎖核酸に、下記のいずれかの手段によって、検出可能な標識からな



る官能基を持たせること。

(I) 官能基を持つ核酸(II)または(III)を使用する。

(II)官能基を持たない核酸(II)または(III)を使用する場合は、官能基を持つ単位核酸の使用によって、該合成核酸鎖を官能基を持つものとして得る。

(III) 該合成核酸鎖を官能基を持たないものとして形成させ、その後、そこへ、該検体中において、官能基を導入する。

(7) 官能基をもつ二本鎖核酸を含む検体を二本鎖核酸と一本鎖核酸および単位核酸とに対して選択的吸着能を持つ固体吸着剤に接触させて、該二本鎖核酸と一本鎖核酸および／または単位核酸とを分離すること。

(カ) 工程(7)より得られる官能基をもつ二本鎖核酸を、該標識からなる官能基を利用する検出操作に付して、この核酸の有無を、検出すべき核酸に対応するものとして検知すること。

2. 固体吸着剤が逆相系の吸着剤である請求項第1項記載の検出法。

3. 逆相系の吸着剤がシリカゲル誘導体である請求項第2項記載の検出法。